

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-199859

(43)Date of publication of application : 19.07.1994

(51)Int.Cl.

C07D473/08

(21)Application number : 05-014393

(71)Applicant : FUJITA GAKUEN

(22)Date of filing : 04.01.1993

(72)Inventor : SUGIMOTO TAKASHI
OGIWARA SHOJI
HIDAKA HIROYOSHI
TERADAIIRA TATSU
FUJITA KEISUKE
NAGATSU TOSHIHARU

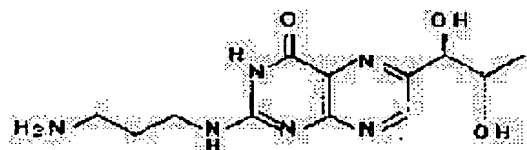
(54) NOVEL NATURAL PTERIDINE, NAMELY ONCOPTERIN AND MEASUREMENT OF ONCOPTERIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a novel compound useful as a diagnostic agent for detecting cancer cells.

CONSTITUTION: 2-(3-Aminopropyl)amino-4-hydroxy-6-[(1'R,2'S)-1',2'- dihydroxypropyl]pteridine of the formula.

The compound of the formula is obtained by applying an anion exchange column to the urine of a cancer patient, washing the anion exchange column, eluting the adsorbed substances with an electrolyte solution, applying a cation exchange column to the eluent, washing the cation exchange column, eluting the adsorbed substances with an acidic solution, applying a reversed phase column to the eluent and subsequently evaporating the eluent to bone dryness.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-199859

(43)公開日 平成6年(1994)7月19日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 D 473/08

審査請求 未請求 請求項の数17(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-14393

(22)出願日 平成5年(1993)1月4日

特許法第30条第1項適用申請有り 1992年7月9日 I
n t e r n a t i o n a l S c i e n c e P u b l
i s h e r s 発行の「Biogenic Amines
第9巻 第1号」に発表

(71)出願人 000125381

学校法人藤田学園

愛知県豊明市栄町南館12番地の1

(72)発明者 杉本 隆

愛知県知立市牛田町高根30の22

(72)発明者 荻原 正二

愛知県名古屋市南区豊1の22の3 トラミ
荘102号室

(72)発明者 日高 弘義

愛知県名古屋市天白区八幡山1101の1の5
の104

(74)代理人 弁理士 加藤 朝道

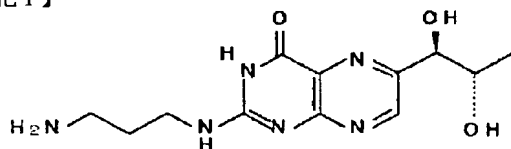
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な天然プテリジン、即ちオンコプテリン及びオンコプテリンの測定方法

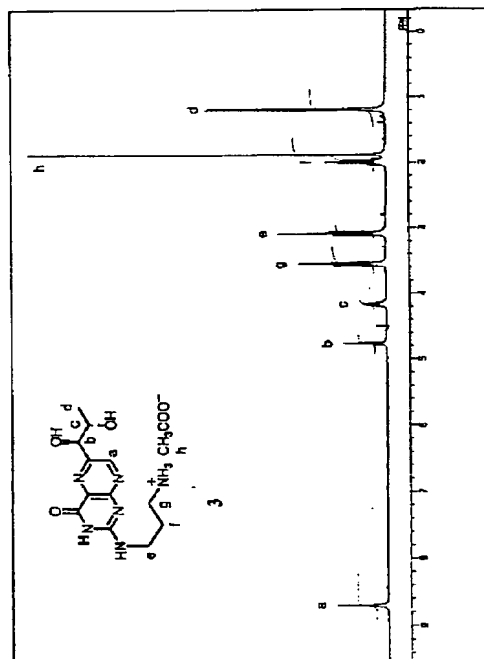
(57)【要約】

【構成】HPLC分析法において、逆相カラム又はカチオン
交換カラムを用い、酸性領域の溶出バッファーで溶出
し、溶出液の蛍光を検出することによって、尿中の下式
のオンコプテリン、即ち2-(3-アミノプロピル)アミノ-4
-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2' -ジヒドロキシプ
ロピル]プテリジンを測定する方法。

【化1】



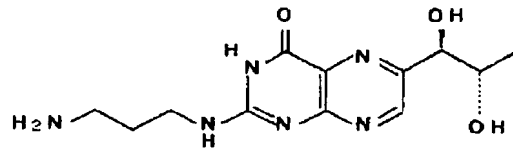
【効果】オンコプテリンは癌患者の尿中に高値に存在す
るのに対して健常者の尿中からは殆ど検出されず、固体
癌又は血液癌の生化学的指標として有用であり、尿中の
オンコプテリンの測定は検体提供者が癌か否かの判断に
役立つ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】式1

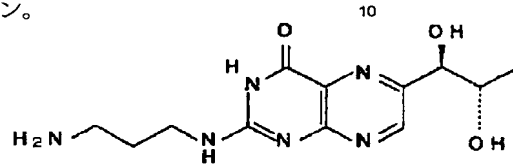
【化1】



式1

で示される2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジン。

【請求項2】ヒトの尿中から単離された、式1
【化2】



式1

で示される2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジン。

【請求項3】前記尿が癌患者から採取された尿であることを特徴とする請求項2に記載の化合物。

【請求項4】前記式1で示される化合物が酸アミド体であることを特徴とする請求項2又は3に記載の化合物。

【請求項5】HPLC分析法において、逆相カラム又はカチオン交換カラムを用い、酸性領域の溶出バッファーで溶出し、溶出液の蛍光強度を測定することによって2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを測定する方法。

【請求項6】酸による加水分解処理をした検体を請求項5に記載の方法で測定する方法。

【請求項7】所定濃度の2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを含有する溶液を用いて描いた標準曲線を用いて、請求項5又は6に記載の方法で蛍光強度を測定した検体中の2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを測定する方法。

【請求項8】ヒトの尿を検体とする請求項5から7の1に記載の方法。

【請求項9】前記尿が癌患者から採取されたものであることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】検体中の2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを測定するための、所定濃度の2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジン溶液を含有する癌細胞検出用診断剤。

【請求項11】ヒトの尿中に含有する2-(3-アミノ

プロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを測定することによって前記ヒトに存在する癌細胞を検出する方法。

【請求項12】(i)尿をアニオン交換カラムにアプライし、洗浄後電解質溶液で溶出し、(ii)溶出液をカチオン交換カラムにアプライし、洗浄後酸性溶液によって溶出し、(iii)溶出液を逆相カラムにかけて、溶出液を蒸発乾固させることを特徴とする、2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを尿中から単離する方法。

【請求項13】前記尿が癌患者の尿であることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】前記尿があらかじめ酸による加水分解処理をした尿であること特徴とする請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】(i)尿をアニオン交換カラムにアプライし、洗浄後電解質溶液で溶出し、(ii)溶出液をカチオン交換カラムにアプライし、洗浄後酸性溶液によって溶出し、(iii)溶出液を逆相カラムにかけて、蒸発乾固させることによって尿中から単離された、2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジン。

【請求項16】前記尿が癌患者の尿であることを特徴とする請求項15に記載の化合物。

【請求項17】前記尿があらかじめ酸による加水分解処理をした尿であること特徴とする請求項15又は16に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規な天然プテリジンであるN²-(3-アミノプロピル)ピオプテリン及びこの化合物の測定方法に関する。前記N²-(3-アミノプロピ

ル) ビオプテリンはある特定の癌の生化学的指標となりうる。

【0002】

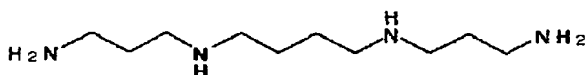
【従来の技術】生体(biogenic)ポリアミン、例えば、プテリジン(1, 4-ジアミノブタン) (式2)、スペルミジン[N-(3-アミノプロピル)-1, 4-ジアミノブタン] (式3) 及びスペルミン[N, N'-ビス



式2

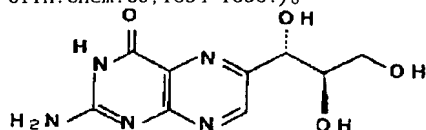


式3



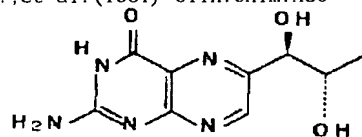
式4

【0004】Russellによって癌患者の尿中にポリアミンが高濃度で最初に観察(Russell, D.H. (1971) *Nature* (New Biol.) 233, 144-145.) されて以来、ヒトの尿及び他の体液中のポリアミンは、種々の固体癌及び血液癌の生化学的指標として大きな臨床的意義をもつと考えられていた(Russell, D.H. and Russell, S.D. (1975) *Clin. Chem.* 21, 860-863; Bachrach, U. (1976) *Ital. J. Biochem.* 25, 77-93.; Fujita, K., et al. (1976) *Cancer Res.* 36, 1320-1324.; Maruta, K., et al. (1989) *Clin. Chem.* 35, 1694-1696.)。



式5

【0006】ビオプテリン(式6) 及び他のある種のプテリジンも、ある癌をもった患者において増大することが報告されている(Rokos, H., et al. (1980) *Clin. Chim. Acta* 105, 275-286.; Stea, B., et al. (1981) *Clin. Chim. Acta* 113, 231-242; Nagatsu, T., et al. (1984) *Biogenic Amines* 1, 51-62.)。



式6

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかし、癌の生化学的指標としてより優れている物質の探求が現在まだ研究されている。即ち、健常者と疾病を有する患者との間で観察される濃度(量)に著しい差があり、かつその疾病ができるだけ癌に特異的であることが好ましく、更にはある特定の癌に特異的であることが好ましい。

【0009】そこで本発明者らは癌患者の尿中には高濃度に存在し、健常者の尿中からは検出されず、かつポリ

(3-アミノプロピル)-1, 4-ジアミノブタン]

(式4) は、急速に成長中の細胞において高い比率で合成される(Dykstra, W.G. and Herbst, E.J. (1965) *Science* 149, 428-429.; Russel, D. and Snyder, S.H. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 60, 1420-1427.)。

【0003】

【化3】

また、種々の形態の癌は、ヒトの尿及び血清中の高レベルのネオプテリン(式5) にも関連され、ネオプテリンは、癌の別の1つの生化学的指標と考えられている(Nixon, J.C. (1985) (Blakley, R.L. and Benkovic, S.J. eds), vol. 1, 2, pp. 1-42. John Wiley & Sons, New York.; Hausen, A., et al. (1989) *Pteridines* 1, 3-10.)。

【0005】

【化4】

a 113, 231-242; Nagatsu, T., et al. (1984) *Biogenic Amines* 1, 51-62.)。

【0007】

【化5】

アミンとプテリンといった二つの癌の生化学的指標の要素を有している物質を確認し、その検出方法を見出すことを目的とする。

【0010】

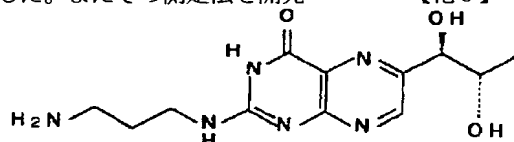
【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的に従い鋭意研究を進めた結果、癌患者の尿中には高濃度に存在し、健常者の尿中からは検出されず、かつポリアミンとプテリンといった二つの癌の生化学的指標の要素を有している新規な天然プテリジンである、2-(3-ア

ミノプロピル) アミノ-4-ヒドロキシ-6- [(1' R, 2' S) -1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジン (式1) を見出した。またその測定法を開発

し、本発明を完成させた。

【0011】

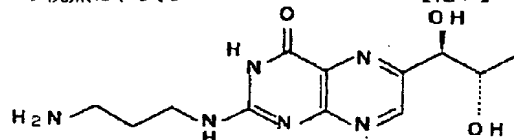
【化6】



式1

【0012】本発明の第一の視点は、式1

【化7】



式1

で示される2-(3-アミノプロピル) アミノ-4-ヒドロキシ-6- [(1' R, 2' S) -1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを提供することである。前記式1で示される化合物は癌患者、特に固体癌の患者の尿中において高値を示す。

【0013】また、本発明の第二の視点は、HPLC分析法において、逆相カラム又はイオン交換カラム、具体的にはカチオン交換カラムを用い、酸性領域の溶出バッファで溶出し、溶出液の蛍光を検出することによって2-(3-アミノプロピル) アミノ-4-ヒドロキシ-6- [(1' R, 2' S) -1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを提供することである。

【0014】更に本発明の第3の視点は、(i)尿をアニオン交換カラムにアプライし、洗浄後電解質溶液で溶出し、(ii)溶出液をカチオン交換カラムにアプライし、洗浄後酸性溶液によって溶出し、(iii)溶出液を逆相カラムにかけて、溶出液を蒸発乾固させることを特

徴とする、2-(3-アミノプロピル) アミノ-4-ヒドロキシ-6- [(1' R, 2' S) -1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを経尿から単離する方法、及び前記方法によって尿から単離された、2-(3-アミノプロピル) アミノ-4-ヒドロキシ-6- [(1' R, 2' S) -1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを提供することである。前記尿はいずれも癌患者の尿であることが好ましい。

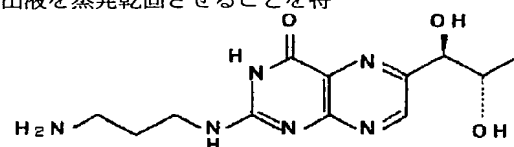
【0015】

【好適な実施態様及び作用】

<定義>本発明で見出した新規な天然プテリジン、下記式1であらわされる2-(3-アミノプロピル) アミノ-4-ヒドロキシ-6- [(1' R, 2' S) -1', 2'-ジヒドロキシプロピル] プテリジンを経本発明者らはオンコプテリンと命名する。

【0016】

【化8】



式1

【0017】<オンコプテリンの単離>本発明者らは癌患者(悪性リンパ腫)の尿中からオンコプテリンと命名した新しい天然プテリジン化合物を単離した。

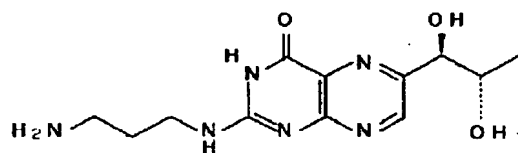
【0018】後述のようにオンコプテリンは酸アミドとしても尿中に存在しているので、あらかじめ酸による加水分解処理を行なうのが好ましい。また、必要に応じて尿は遠心処理を行なう。オンコプテリンの精製は、一般的には陰イオン交換、陽イオン交換、及び逆相カラムクロマトグラフィーを順次用いることによって行なうことができる。

【0019】オンコプテリン (式1)、ネオプテリン

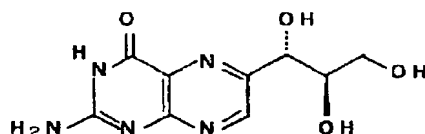
(式5) 及びピオプテリン (式6) は、DEAEアニオン交換カラム内を一緒に移動する。しかしオンコプテリンは、CMカチオン交換カラムクロマトグラフィーによって、ピオプテリン及びネオプテリンから十分に分離された。即ち、ピオプテリン及びネオプテリンは、水によって溶出され、オンコプテリンは、その強塩基としての性質のため、カラム内に保持される。酸性溶液によって溶出されたオンコプテリンは逆相カラムクロマトグラフィーによって、更に精製される。

【0020】

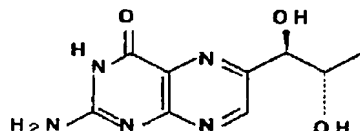
【化9】



式1



式5



式6

【0021】

【実施例1】悪性リンパ腫の患者からの尿(80l)を回転蒸発器によって約2lに濃縮、遠心分離し、沈澱を除去した。上清の一部50mlをDEAE-Cellulofineカラム(内径10cm×50cm)にアプライし、洗浄液が中性となるまでカラムを水洗した。次にカラムを2.8%アンモニア(3.5l)にて溶出し、溶出液を回転蒸発器によって約100mlに濃縮した。

【0022】その溶液をCM-Cellulofineカラム(内径10cm×50cm)に適用し、最初水(3l)で、次に3%蟻酸(3l)で、それぞれ溶出した。残りの上清についても同様にして分別した。このようにして複数回にわたった前記CM-Cellulofineカラムからの蟻酸による溶出液を混合して一つにまとめ、回転蒸発器にて蒸発乾固させた。

【0023】残渣を水(50ml)に溶解させ、溶液25mlずつをFlorisilカラム(内径2cm×40cm)にアプライした。カラムを、水(1.5l)で洗浄した後、2.8%アンモニア(600ml)によって溶出した。2回分のアンモニアによる溶出液を混合して一つにまとめ、蒸発乾固させた。

【0024】残渣を水(24ml)に溶解させ、溶液の一部8mlをODS CQ-3カラム(内径5.0cm×45cm)を用いた中圧クロマトグラフィーに付し、2%酢酸によって溶出した。この操作を更に2回反復し、溶液の残りを分別した。その後、調製用ODSカラム(内径20mm×250mm)を用いたHPLCを行い水にて溶出させ、溶出液を蒸発させることによって、オンコプテリンを酢酸塩(4.9mg)として得た。

【0025】<オンコプテリンの構造決定>実施例1によって単離されたオンコプテリンの構造を決定するために各種の分光学的測定が行なわれた。¹H NMRスペクトルはJEOL JNM-EX270分光計によって50℃ D₂O中にて測定された。日立220A分光光度計を用いて水中にてUVスペクトルを測定した。CDスペクトルは水中にてJASCO J-500分光旋光計によって記録された。

【0026】図1に示すようにオンコプテリンのUVスペクトル[λ_{max}/nm (log ε): 218 (4.25)、243 (4.18)、279 (4.35)、349 (3.91)]は、ネオプテリン及びビオプテリンのものと類似し、これは、3つの全部の化合物が同一の発色団、即ち2-アミノ-4-ヒドロキシブテリジンをもつことを示した。

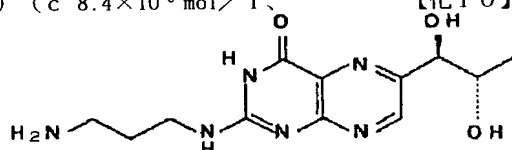
【0027】オンコプテリンの¹H NMRシグナルを図2に示す。このうちで、8.71ppmにおいての一重線(シグナルa; 1H)は、ブテリジン環に結合したプロトンによるもので、1.97ppmの他の一重線(シグナルh、3H)は、アセテートアニオンのアセチル基によるものであった。4.77ppm(シグナルb; 1H、d、J=4.6Hz)、4.13~4.22ppm(シグナルc、1H、m)及び1.19ppm(シグナルd; 3H、d、J=6.3Hz)のシグナルは、1, 2-ジヒドロキシプロピル基によるものである。3.10ppm(シグナルe; 2H、t、J=6.9Hz)、1.95~2.05ppm(シグナルf; 2H、m)及び3.56ppm(シグナルg; 2H、t、J=6.6Hz)は、トリメチレン基によるものである。

【0028】これらのスペクトル及び強塩基としての性質から、オンコプテリンは、N²-(3-アミノプロピル)ビオプテリンの1つの立体異性体即ち2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1'R, 2'S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル]ブテリジンであると決定された。

【0029】真正な、2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1'R, 2'S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル]ブテリジン、つまりオンコプテリンを、Sawada, M., et al. (1984) Clin. Chim. Acta 113, 231-242.に従って合成し、この合成オンコプテリンと実施例1で単離されたオンコプテリンとをHPLC法により、直接に比較させて確かめた。前記HPLC分析は、逆相カラム(内径4.6mm×250mm)を用いて2%メタノール含有30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーによって溶出し、又はカチオン交換カラム(4.6mm内径

×250mm) を用いて10%メタノール含有30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーによって溶出し、蛍光強度(励起波長、355nm、発光波長、450nm)を測定した。

【0030】¹H NMRとUVスペクトルとの比較もこの決定を支持した。尿検体からのオンコプテリン、合成オンコプテリン共に、同一の図3に示すCDスペクトル[λ_{max}/nm (Δε): 380 (-0.04)、333 (-0.36)、289 (-0.20)、269 (-0.81)、259 (-0.47)、242 (-1.50)、221 (+3.00) (c 8.4×10⁻⁵ mol/l、



式1

【0033】

＜オンコプテリン量を測定するためのHPLC法＞本発明者らは尿中のオンコプテリン濃度はポリアミン類のように酸による加水分解の後では上昇することを見出した。従って、総オンコプテリン濃度は酸による加水分解の後に測定する。また、遠心処理は必要に応じて行なう。HPLC分析には逆相カラム又はカチオン交換カラムを用い、酸性領域を示す溶出バッファーで溶出し、この溶出液についてオンコプテリンの蛍光を測定する。所定量のオンコプテリンを含有する標準液についても同様の操作を行ない、その蛍光強度とオンコプテリン含有量の関係から標準曲線を作成し、これより検体中のオンコプテリン量を測定する。

【0034】

【実施例2】肝臓癌患者の尿を検体とする。尿(120μl)と6M塩酸(60μl)の混合液を栓をしたガラス管中で、100℃、2時間加熱し、次に凍結乾燥した。残渣は30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーと良く混合してから、3000rpm、10分間遠心分離を行なった。上清の5μl(5μl尿に相当)をHPLC分析に使用した。

【0035】オンコプテリンのHPLC分析は、逆相カラム(内径4.6mm×250mm)を用いて30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーによって溶出し(1.0ml/min)、又はカチオン交換カラム(内径4.6mm×250mm)を用いて10%メタノール含有100mMリン酸アンモニウムpH3.5バッ

水)]をあらわしたので、オンコプテリンの1', 2'-ジヒドロキシプロピル側鎖の立体配位は、(1' R, 2' S)、即ちL-エリスロであると決定された。

【0031】以上からオンコプテリンの構造は式1に示される2-(3-アミノプロピル)アミノ-4-ヒドロキシ-6-[(1' R, 2' S)-1', 2'-ジヒドロキシプロピル]プテリジンであると決定された。

【0032】

【化10】

アーによって溶出し(1.0ml/min)、溶出液の蛍光強度(励起波長、355nm、発光波長、450nm)を測定した。

【0036】標準物質として、実施例1の記載に従って単離された真正なオンコプテリンを用いた(10 pmol/5μl尿)。尿中のクレアチニン濃度はBoutwell, J.H. (1961) Clinical Chemistry, Laboratory Manual and Methods, pp.184-188, Lea & Febiger, Philadelphia. で報告された方法に従って測定した。

【0037】その結果を図4及び図5に示す。図4は逆相カラムを用いて30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーで溶出した(1.0ml/min)クロマトグラムをあらわす。図5はカチオン交換カラムを用いて10%メタノール含有100mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーで溶出した(1.0ml/min)クロマトグラムをあらわす。図4

(b)と図5(b)はそれぞれのカラムにおいて標準物質を添加した試料溶液のクロマトグラムをあらわす。

【0038】

【実施例3】HPLC分析には逆相カラムを用い、実施例2と同様の方法で、種々の癌患者及び健常者の早朝第一尿検体のオンコプテリン濃度を測定した。この分析において最小分析限界は0.2pmol/5μlであった。結果を表1に示す。

【0039】

【表1】

健常者と癌患者の尿中におけるオンコプテリンの濃度

疾患	標本数 (n)	年齢 平均	オンコプテリン ($\mu\text{mol/mol}$ クレアチニン) 平均 \pm S E
健常者	(10)	27.2	1.7 \pm 1.7
肺癌	(11)	67.9	51.6 \pm 27.6
肝臓癌	(10)	63.1	118.7 \pm 35
前立腺癌	(5)	73.4	197.6 \pm 91
膀胱癌	(7)	61.3	132.6 \pm 72
子宮癌	(6)	50.8	46.6 \pm 46.7
骨髄腫	(10)	57.4	9.4 \pm 14.5
急性骨髄性白血病	(11)	40.5	4.2 \pm 4.2
リンパ腫	(15)	50.1	17.2 \pm 10.6

【0040】酸による加水分解を行わない場合、オンコプテリンは健常者からは殆ど検出されなかった。このことから、おそらくオンコプテリンは尿中では未知の酸アミドとして存在しているものと推定される。

【0041】健常者の尿中のオンコプテリン濃度はとても低かった。しかし、肝臓癌、前立腺癌、膀胱癌のような固体癌の患者は尿中のオンコプテリン濃度の統計的に重要な増加を示した。骨髄腫、リンパ腫、急性骨髄性白血30 病のような血液癌の患者は低い値を示したが、コントロール尿よりは高値であった。濃度が大きくばらついている理由の一つには癌患者の臨床状態が異なっていることが考えられる。

【0042】種々の癌患者の尿中のポリアミン及びネオプテリンの濃度はそれぞれ2～10倍(Fujita, K., et al. (1976) Cancer Res. 36, 1320-1324.; Maruta, K., et al. (1989) Clin. Chem. 35, 1694-1696.), 2～8倍(Stea, B., et al. (1981) Clin. Chim. Acta 113, 231-242.; Rokos, K., & Rokos, H., (1982) in Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines(Wachter, H., Curtius, H.C., & Pfleiderer, W., eds.) Vol. 1, pp117-130, Walter de Gruyter & Co., Berlin.)に増加した。ところが癌患者の中にはオンコプテリンの尿中の濃度が約70～100倍に増加したものもいた。このようにオンコプテリンは、ポリアミンやネオプテリンより癌の生化学的指標として有用であると期待できる。

【0043】従って、尿中のオンコプテリン濃度を測定する方法を確立することは重要であり、本発明はHPLC法を利用したオンコプテリンの測定方法を提供するも50

のである。

【0044】癌患者においては、オンコプテリンは、ポリアミンや他のプテリジン類と同様に尿中以外の血液を初めとする体液中で増加していることが考えられ、本発明者らは更に研究を続けている。

【0045】本発明でオンコプテリンの単離ができるようになり、且つ構造も決定され合成も可能になった。今後、オンコプテリンの抗体が製造されるようになれば、ラジオアイソトープや酵素を利用した免疫学的測定法が可能になり、より高感度で且つ信頼性の高い測定ができるようになるであろう。

【0046】

【発明の効果】オンコプテリンは癌患者の尿中に高値に存在するのに対して健常者の尿中からは殆ど検出されない50 ので、癌、即ち固体癌及び血液癌の生化学的指標として有用である。従って、本発明によりオンコプテリン測定が可能になり、検体提供者が癌であるかどうかの判断に役立つ。また、オンコプテリンが尿中から容易に単離されるようになったので、生成経路の解明等の更なる研究が大いに活発になるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】オンコプテリン酢酸塩の水中におけるUVスペクトラム。

【図2】オンコプテリン酢酸塩の ^1H NMRスペクトラム(270MHz, D_2O , 50°C)。それぞれのシグナルは構造式に記されているアルファベットの炭素原子と結合する水素原子によるシグナルに対応している。

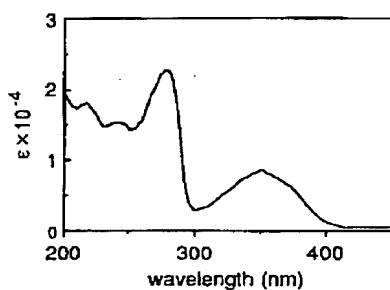
【図3】オンコプテリン酢酸塩の水中におけるCDスペ

クトラム ($c = 8.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$)。

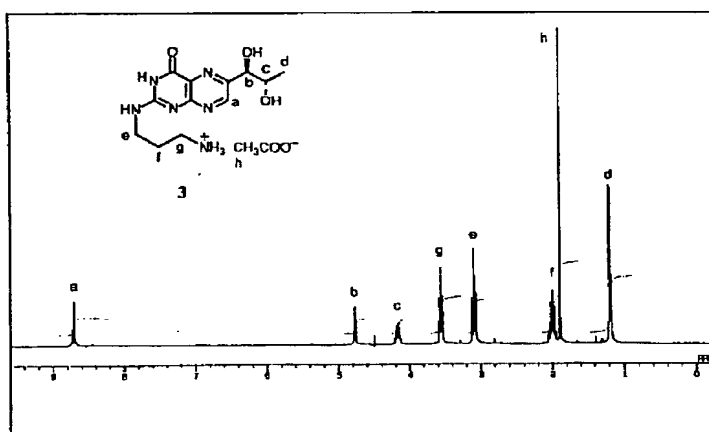
【図4】実施例2のHPLC分析によるクロマトグラム。(a) 肝臓癌患者の尿(オンコプテリン濃度 $254 \mu\text{mol/mol}$ クレアチニン)における逆相カラムを用いて30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーで溶出した(1.0ml/min)クロマトグラム。(b) 上記尿試料にオンコプテリンの標準溶液(10 pmol)を添加した溶液における逆相カラムを用いて30mMリン酸アンモニウムpH3.5バッファーで溶出した(1.0ml/min)クロマトグラム。

【図5】実施例2のHPLC分析によるクロマトグラ

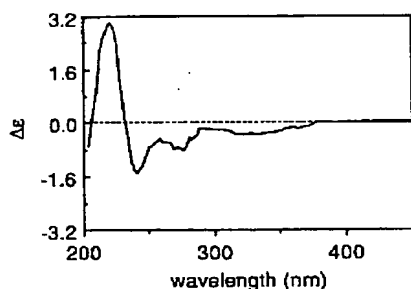
【図1】



【図2】

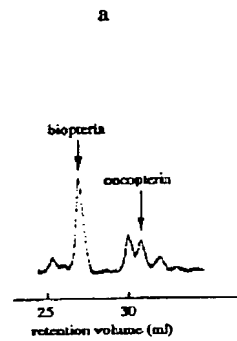


【図3】

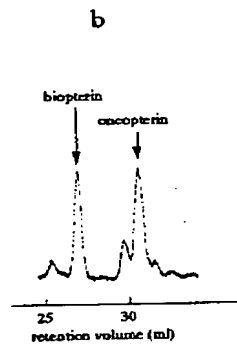


【図4】

(a)



(b)

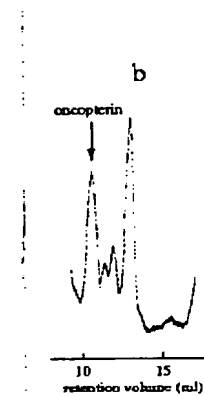


【図5】

(a)



(b)



フロントページの続き

(72)発明者 寺平 竜
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田
保健衛生大学総合医科学研究所内

(72)発明者 藤田 啓介
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田
保健衛生大学総合医科学研究所内

(72)発明者 永津 俊治
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田
保健衛生大学総合医科学研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.